

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/002331

International filing date: 16 February 2005 (16.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-040381
Filing date: 17 February 2004 (17.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 14 April 2005 (14.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

18.02.2005

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 2 月 1 7 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 0 4 0 3 8 1
Application Number:

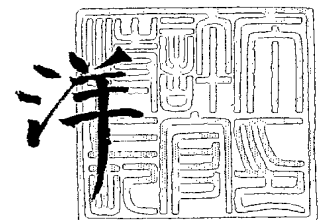
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 4 - 0 4 0 3 8 1]

出 願 人 サ ッ ポ ロ ビ ー ル 株 式 会 社
Applicant(s):

2 0 0 5 年 3 月 3 1 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 510-1387
【提出日】 平成16年 2月17日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12Q 1/04
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県焼津市岡当目 1 0 サッポロビール株式会社 価値創造フ
 ロンティア研究所内
 【氏名】 中北 保一
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県焼津市岡当目 1 0 サッポロビール株式会社 価値創造フ
 ロンティア研究所内
 【氏名】 土屋 陽一
【特許出願人】
 【識別番号】 303040183
 【氏名又は名称】 サッポロビール株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100088155
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 長谷川 芳樹
【選任した代理人】
 【識別番号】 100089978
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 塩田 辰也
【選任した代理人】
 【識別番号】 100092657
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 寺崎 史朗
【選任した代理人】
 【識別番号】 100128381
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 清水 義憲
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 014708
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【物件名】 原寄託についての受託証の写し 2
 【援用の表示】 追って手続補足書にて提出する。

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

配列番号 1 ～ 5 に示す塩基配列の全部又は一部からなるポリヌクレオチド。

【請求項 2】

配列番号 6 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号 7 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとからなる、ラクトバチルス・ヘキソーサス (*Lactbacillus hexosus*) 検出用プライマーセット。

【請求項 3】

配列番号 7 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号 8 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとからなる、ラクトバチルス・シュードコリノイデス (*Lactbacillus pseudocollinoides*) 検出用プライマーセット。

【請求項 4】

配列番号 9 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号 10 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとからなる、ペディオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) 検出用プライマーセット。

【請求項 5】

配列番号 30 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号 11 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号 12 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号 13 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号 14 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、からなる乳酸菌の検出・識別用プライマーセット。

【請求項 6】

配列番号 15 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号 16 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号 17 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号 18 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号 19 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、からなる乳酸菌の検出・識別用プローブセット。

【請求項 7】

請求項 5 記載のプライマーセット及び請求項 6 記載のプローブセットを含むことを特徴とする乳酸菌の検出・識別用キット。

【請求項 8】

請求項 2 記載のプライマーセットを用いて核酸断片を増幅する工程、及び、得られた核酸断片を検出する工程を含むことを特徴とする遺伝子増幅法によるラクトバチルス・ヘキソーサス (*Lactbacillus hexosus*) の検出方法。

【請求項 9】

請求項 3 記載のプライマーセットを用いて核酸断片を増幅する工程、及び、得られた核酸断片を検出する工程を含むことを特徴とする遺伝子増幅法によるラクトバチルス・シュードコリノイデス (*Lactbacillus pseudocollinoides*) の検出方法。

【請求項 10】

請求項 4 記載のプライマーセットを用いて核酸断片を増幅する工程、及び、得られた核酸断片を検出する工程を含むことを特徴とする遺伝子増幅法によるペディオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) の検出方法。

【請求項 11】

請求項 5 記載のプライマーセットを用いて核酸断片を増幅する工程、及び、得られた核酸断片と請求項 6 記載のプローブセットとのハイブリッドの融解温度を測定する工程を含むことを特徴とする乳酸菌の検出・識別方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】乳酸菌の検出・識別方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、乳酸菌の検出・識別方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年のビールの生ビール化への流れは、ビール鮮度という新たな価値観をもたらした。こうした背景から、ビール製造会社にとっては、ビールの製造から出荷までの時間を劇的に短縮するために、ビールを混濁させる菌（ビール混濁菌）の汚染を迅速かつ正確に判定する必要が高まっている。

【0003】

汚染事例が最も多いビール混濁菌として乳酸菌が挙げられる。乳酸菌の迅速な検出方法として、PCR法（ポリメラーゼ連鎖反応法）、FISH法（蛍光 *in situ* ハイブリッド形成法）を利用した各種検出法が既に知られている（例えば、特許文献1～5参照）。

【特許文献1】特開平5-15400号公報

【特許文献2】特開平6-141899号公報

【特許文献3】特開平7-289295号公報

【特許文献4】特開平10-210980号公報

【特許文献5】特開平14-034578号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかしながら、本発明者らは、ビールを混濁させる新規な乳酸菌を発見し、上記従来技術の方法では当該菌を検出できない可能性があることを見出した。

【0005】

したがって、本発明の目的は、従来の方法では検出できなかったビールを混濁させ得る乳酸菌を検出する方法を提供することにある。本発明の目的は、さらに、当該菌を含めた様々な乳酸菌を同時に検出・識別する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

上記目的を達成するために、本発明は、配列番号1～5に示す塩基配列の全部又は一部からなるポリヌクレオチドを提供する。

【0007】

本発明は、また、配列番号6に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号7に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとからなる、ラクトバチルス・ヘキソーサス (*Lactobacillus hexosus*) 検出用プライマーセット、並びに、当該プライマーセットを用いて核酸断片を増幅する工程、及び、得られた核酸断片を検出する工程を含むことを特徴とする遺伝子増幅法によるラクトバチルス・ヘキソーサス (*Lactobacillus hexosus*) の検出方法を提供する。

【0008】

本発明は、また、配列番号7に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号8に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとからなる、ラクトバチルス・シュードコリノイデス (*Lactobacillus pseudocollinoides*) 検出用プライマーセット、並びに、当該プライマーセットを用いて核酸断片を増幅する工程、及び、得られた核酸断片を検出する工程を含むことを特徴とする遺伝子増幅法によるラクトバチルス・シュードコリノイデス (*Lactobacillus pseudocollinoides*) の検出方法を提供する。

【0009】

本発明は、また、配列番号9に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号1

0 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとからなる、ペディオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) 検出用プライマーセット、並びに、当該プライマーセットを用いて核酸断片を増幅する工程、及び、得られた核酸断片を検出する工程を含むことを特徴とする遺伝子増幅法によるペディオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) の検出方法を提供する。

【0010】

本発明は、さらに、配列番号 30 及び 11～14 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドからなる乳酸菌の検出・識別用プライマーセット、配列番号 15～19 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドからなる乳酸菌の検出・識別用プローブセット、当該プライマーセット及び当該プローブセットを含むことを特徴とする乳酸菌の検出・識別用キット、並びに、当該プライマーセットを用いて核酸断片を増幅する工程、及び、得られた核酸断片と当該プローブセットとのハイブリッドの融解温度を測定する工程を含むことを特徴とする乳酸菌の検出・識別方法を提供する。

【0011】

本発明者らは、既知の方法では検出できないビールを混濁させ得る乳酸菌である *L. hexosus* 及び *L. pseudocollinoides* を分離することに成功し、*L. hexosus* SBC8050 株（未承認名）及び *L. pseudocollinoides* SBC8057 株（未承認名）の 16S リボソーム RNA 遺伝子（16S rRNA 遺伝子）の塩基配列が、それぞれ、配列番号 1 及び 3 に示す塩基配列であることを明らかにし、*g y r B* 遺伝子の塩基配列の一部が、それぞれ、配列番号 2 及び 4 に示す塩基配列であることを明らかにした。また、ビール中で増殖し得る乳酸菌であるペディオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) の *g y r B* 遺伝子の塩基配列の一部が、配列番号 5 に示す塩基配列であることを明らかにした。*L. hexosus* SBC8050 株及び *L. pseudocollinoides* SBC8057 株は、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託されており、寄託番号は、それぞれ、FERM BP-08529 及び FERM BP-08530 である。

【0012】

L. hexosus 検出用プライマーセット、*L. pseudocollinoides* 検出用プライマーセット又は *P. damnosus* 検出用プライマーセットを用いることにより、それぞれ、*L. hexosus*、*L. pseudocollinoides* 又は *P. damnosus* の *g y r B* 遺伝子の特異的に増幅することができるため、それぞれ、*L. hexosus*、*L. pseudocollinoides* 又は *P. damnosus* を検出することが可能となる。

【0013】

また、乳酸菌の検出・識別用プライマーセットを用いることにより、様々な乳酸菌の 16S rRNA 遺伝子又は *g y r B* 遺伝子を増幅することができる。そして、得られた核酸断片と乳酸菌の検出・識別用プローブセットとのハイブリッドの融解温度を測定することにより、核酸断片の由来している混濁菌の種類の違いによって融解温度が異なるため、融解温度の違いにより乳酸菌の検出及び識別することが可能となる。

【発明の効果】

【0014】

従来の方法では検出できなかったビールを混濁させ得る乳酸菌を検出する方法及び当該菌を含めた様々な乳酸菌を同時に検出・識別する方法を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

【0016】

<ポリヌクレオチド>

まず、本発明のポリヌクレオチドについて説明する。本発明のポリヌクレオチドは、配列番号 1～5 に示す塩基配列の全部又は一部からなることを特徴とするが、配列番号 1～5 に示す塩基配列の相補配列の全部又は一部からなるポリヌクレオチドをも含む。ここで、配列番号 1 及び 3 は、それぞれ、*L. hexosus* 及び *L. pseudocollinoides* の 16S rR

NA 遺伝子の塩基配列を表わす。また、配列番号 2、4 及び 5 は、それぞれ、*L. hexosus*、*L. pseudocollinoides* 及び *P. damnosus* の *gyrB* 遺伝子の塩基配列の一部を表わす。本発明のポリヌクレオチドは、以下に述べるように、上記乳酸菌を検出する上で有用であり、乳酸菌の検出用プライマー、プライマーにより増幅された核酸断片、検出用プローブ等として使用可能である。また、本発明のポリヌクレオチドは蛍光物質等により化学修飾されていてもよい。

【0017】

本発明のポリヌクレオチドが乳酸菌の検出用プライマー又は検出用プローブとして使用される場合には、ヌクレオチドの長さが 10～30（好ましくは 15～25）であるオリゴヌクレオチドであることが望ましい。プライマーの設計は、当業者であれば容易に行うことができ、必要があれば、プライマー設計支援ソフトウェアを利用して設計することも可能である。

【0018】

なお、本発明において「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」とは、DNA、RNA 及び PNA（ペプチド核酸）を含む意味で用いられる。また、本発明のポリヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドは、例えば、ホスホロアミダイト法等の公知の方法により合成することが可能である。

【0019】

<*L. hexosus*の検出>

次に、本発明の *L. hexosus* 検出用プライマーセット及びそれを用いた *L. hexosus* の検出方法について説明する。本発明の *L. hexosus* 検出用プライマーセットは、配列番号 6 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号 7 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとからなることを特徴とし、両オリゴヌクレオチドは *L. hexosus* の *gyrB* 遺伝子に特異的な塩基配列を有していることから、*L. hexosus* の *gyrB* 遺伝子の特異的に増幅することができるため、*L. hexosus* を特異的に検出することが可能である。

【0020】

本発明の検出方法により *L. hexosus* の検出を行うには、まず、試料（例えば、ビールや発泡酒などの麦芽飲料）から核酸を抽出する。核酸の抽出は、当技術分野で公知の方法を使用することによりでき、具体的には例えば、フェノール抽出及びエタノール沈殿を行う方法、ガラスビーズを用いる方法などにより DNA を抽出することができ、AGPC 法やグアニジン・塩化セシウム超遠心法などにより RNA を抽出することができる。

【0021】

次に、得られた核酸を鋳型とし、前記プライマーセットを用いて核酸断片を増幅する。増幅方法として、当技術分野で公知の増幅方法を用いることができるが、特に、PCR 法又は RT-PCR 法が好ましい。PCR 法では、抽出された DNA を鋳型として、DNA ポリメラーゼにより、*gyrB* 遺伝子のうちプライマーセットに挟まれた部分の塩基配列からなる核酸断片が増幅される。PCR 法では、変性、アニーリング、相補鎖合成からなるサイクルを繰り返すことにより核酸断片（二本鎖 DNA）が、各工程の温度や時間、サイクル数等の PCR の最適条件は、当業者であれば容易に決定することができる。RT-PCR 法では、抽出された RNA を鋳型として、逆転写酵素により cDNA を合成し、得られた cDNA を鋳型として PCR 法を行うものである。

【0022】

次に、増幅された核酸断片を検出する。すなわち、増幅された核酸断片が *L. hexosus* に特異的なものか否かを判定する。検出は、当技術分野で公知の方法により行うことができ、例えば、*L. hexosus* に特異的にハイブリダイズするプローブを用いたハイブリダイゼーションにより行うことが可能である。

【0023】

<*L. pseudocollinoides*の検出>

次に、本発明の *L. pseudocollinoides* 検出用プライマーセット及びそれを用いた *L. pseudocollinoides* の検出方法について説明する。本発明の *L. pseudocollinoides* 検出用プラ

イマーセットは、配列番号 7 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号 8 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとからなることを特徴とし、両オリゴヌクレオチドは *L. pseudocollinoides* の *gyrB* 遺伝子に特異的な塩基配列を有していることから、*L. pseudocollinoides* の *gyrB* 遺伝子の特異的に増幅することができるため、*L. pseudocollinoides* を特異的に検出することが可能である。

【0024】

L. pseudocollinoides の検出方法は、上記の *L. hexosus* の検出方法と同様に行うことが可能である。

【0025】

＜*P. damnosus* の検出＞

次に、本発明の *P. damnosus* 検出用プライマーセット及びそれを用いた *P. damnosus* の検出方法について説明する。本発明の *P. damnosus* 検出用プライマーセットは、配列番号 9 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号 10 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとからなることを特徴とし、両オリゴヌクレオチドは *P. damnosus* の *gyrB* 遺伝子に特異的な塩基配列を有していることから、*P. damnosus* の *gyrB* 遺伝子の特異的に増幅することができるため、*P. damnosus* を特異的に検出することが可能である。

【0026】

P. damnosus の検出方法は、上記の *L. hexosus* の検出方法と同様に行うことが可能である。

【0027】

＜乳酸菌の検出・識別＞

最後に、本発明の乳酸菌の検出・識別用プライマーセット、プローブセット及びキット並びにそれらを用いた乳酸菌の検出・識別方法について説明する。

【0028】

本発明の乳酸菌の検出・識別用プライマーセットは、配列番号 30 及び 11～14 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドからなることを特徴とする。なお、配列番号 30 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドは、16S rRNA 遺伝子のユニバーサルプライマーである。本発明のプライマーセットを用いることにより、様々な乳酸菌の核酸断片を増幅することが可能である。

【0029】

本発明の乳酸菌の検出・識別用プローブセットは、配列番号 15～18 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドからなることを特徴とする。本プローブセットは、以下に述べるように、様々な乳酸菌の核酸断片を検出するのに用いることができ、乳酸菌を検出・識別することが可能である。

【0030】

本発明の乳酸菌の検出・識別用キットは、前記プライマーセットと前記プローブセットを含むことを特徴とする。本キットは、さらに、反応バッファー、dNTP 混合物、酵素などを含んでもよく、DNA 抽出試薬などを含んでもよい。

【0031】

本発明の検出・識別方法により乳酸菌を検出・識別するには、まず、試料（例えば、ビールや発泡酒などの麦芽飲料）から核酸を抽出する。核酸の抽出は、前述の方法と同様の方法により行うことができる。

【0032】

次に、得られた核酸を鋳型とし、前記プライマーセットを用いて核酸断片を増幅する。増幅は、前述の方法と同様の方法により行うことができ、PCR 法又は RT-PCR 法が好ましい。

【0033】

次に、得られた核酸断片と前記プローブセットとのハイブリッドを形成させ、ハイブリッドの融解温度を測定する。融解温度の測定原理の概要は次のとおりである。配列番号 15～16 及び 17～18 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドは、それぞれ、5'

末端が蛍光物質である LC Led 640 及び LC Led 705 で標識されている（以下、それぞれ「Led 640 プローブ」及び「Led 705 プローブ」という。）。一方、配列番号 19 に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドは、3' 末端が FITC で標識されている（以下、「FITC プローブ」という。）。そして、各プローブは、FITC プローブの 3' 末端と Led 640 プローブ及び Led 705 プローブの 5' 末端とが近接して乳酸菌の核酸断片とハイブリダイズするように設計されている。核酸断片に FITC プローブと Led 640 プローブ（又は Led 705 プローブ）とがともにハイブリダイズしている状態で、ハイブリッドに FITC の励起波長の光を照射すると、FRET（蛍光共鳴エネルギー移動）が生じ、Led 640（又は Led 705）の蛍光波長の光が観察される。この状態から温度を上昇させていくと、FITC プローブ及び／又は Led 640 プローブ（又は Led 705 プローブ）が融解して核酸断片から剥がれていき、それに従って FRET が生じなくなり Led 640（又は Led 705）の蛍光強度が減少していく。そして、各温度における蛍光強度を測定し、横軸に温度をとり、縦軸に蛍光強度（変化率も含む）をとれば、融解曲線が得られる。このようにして得られた融解曲線を解析することにより、ハイブリッドの融解温度を求めることができる。

【0034】

FITC プローブ及び／又は Led 640 プローブ（又は Led 705 プローブ）は、核酸断片とのミスマッチの程度が乳酸菌の種類によって差が生じるように設定してある。したがって、乳酸菌の種類によって、それぞれのプローブの示す融解曲線及び融解温度が異なるため、その違いに基づいて乳酸菌の種類を判別することが可能である。具体的には、*L. brevis* SBC8003 株は約 60℃、*L. hexosus* SBC8050 株は約 56℃ 及び約 63℃、*P. damnosus* JCM5886 株は約 62℃、*L. pseudocollinoides* SBC8057 株は約 64℃、*L. collinoides* JCM1123 株は約 58℃ の融解温度を示す。試料の融解温度とこれらの融解温度を比較することにより、試料中に含まれている乳酸菌の検出・識別を行うことができる。

【0035】

なお、本発明のプローブセットは、核酸断片を増幅する反応溶液に混ぜておくことができるため、核酸断片の増幅反応が終了後ただちに融解温度を測定することができる。したがって、本発明の乳酸菌の検出・識別方法は、1つのチューブやキャピラリー内で核酸断片を増幅する工程と融解温度を測定する工程を連続して行えるという利点がある。

【実施例】

【0036】

以下、実施例を挙げて本発明について更に詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0037】

（実施例 1） *L. hexosus* 及び *L. pseudocollinoides* の植菌によるビールの混濁

L. hexosus SBC8050 株及び *L. pseudocollinoides* SBC8057 株を、それぞれ、MRS 寒天培地（ベベクトン・ディッキンソン社）で増殖させた。1 白金耳量の各菌株を、それぞれ、瓶入りの全麦芽ビール（pH 4.5、苦味価 30、アルコール 5%、容量 350 mL）に植菌し、ビール瓶に打栓をし、30℃ にて約 1 ヶ月間培養を行ったところ、ビールが混濁した。

【0038】

表 1 は培養 1 ヶ月後の混濁ビール中の有機酸の濃度（正常ビールに対する比率（%））を示したものである。*L. hexosus* SBC8050 株を植菌した混濁ビールは、正常ビールに比べ、乳酸の濃度が約 3 倍になった。このことから、*L. hexosus* はホモ発酵タイプの乳酸菌であることが分かった。一方、*L. pseudocollinoides* SBC8057 株を植菌した混濁ビールは、正常ビールに比べ、乳酸の濃度が約 4 倍になり、酢酸の濃度が約 2 倍になった。このことから、*L. pseudocollinoides* はヘテロ発酵タイプの乳酸菌であることが分かった。

【0039】

【表1】

有機酸	<i>L. hexosus</i> SBC8050	<i>L. pseudocollinides</i> SBC8057
リンゴ酸	1 7	9 9
乳酸	3 2 6	4 1 0
酢酸	1 1 5	1 9 1
コハク酸	9 5	9 4

【0040】

(実施例2) 16S rRNA遺伝子及びgyrB遺伝子のシーケンス
(ゲノムDNAの調製)

L. hexosus SBC8050株及び*L. pseudocollinides* SBC8057株を、それぞれ、MRS寒天培地に植菌し、30℃にて、7～14日間、嫌気培養を行った。嫌気培養は、タバイエスベック社製の嫌気培養装置を用い、 $N_2 : H_2 : CO_2 = 90 : 5 : 5$ という条件で行った。嫌気培養した菌株の菌体から、それぞれ、DNA抽出液PrepMan Ultra (アプライド・バイオシステムズジャパン社)を用いて、DNAの抽出を行った。

【0041】

(16S rRNA遺伝子の増幅・解析)

上記方法により調製したDNA抽出液について、MicroSeq Full Gene 16S rDNAキット (アプライド・バイオシステムズジャパン社)を用いて、各菌株の16S rRNA遺伝子のシーケンスをそれぞれ行った。

【0042】

シーケンスの結果得られた*L. hexosus* SBC8050株及び*L. pseudocollinides* SBC8057株の16S rRNA遺伝子配列を、それぞれ、配列番号1及び3に示す。本遺伝子配列は、現在までに報告されているビールを混濁させる乳酸菌の遺伝子配列とは、明らかに異なっていた。さらに、GenBank等のデータベース検索を行ったが、登録されている何れの遺伝子配列とも一致しなかった。したがって、*L. hexosus*及び*L. pseudocollinides*はビールを混濁させる新規な乳酸菌であることが明らかとなった。

【0043】

(gyrB遺伝子の増幅・解析)

反応液TaKaRa Ex Taq (寶酒造社)に、上記DNA抽出液、及びプライマーセット (*L. hexosus*及び*L. pseudocollinoides*については、配列番号26に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド (GYPF: 5' -ggwtayaargtwcwggtggt-3') 及び配列番号27に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド (GYPR: 5' -tcatgygtwcaccttcat-3') のセットを、*Pediococcus damnosus*については、配列番号28に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド (GP1-F: 5' -attatgntgcnnngcaaatncaa-3') 及び配列番号29に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド (GP1-R: 5' -accaccwgawacytttrtawcc-3') のセットを使用)を加え、GeneAmp PCR System 9700 (アプライド・バイオシステムズジャパン社)を用いてPCRを行った。1サイクルを95℃で30秒間 (DNA変性)、55℃で30秒間 (アニーリング)、72℃で45秒間 (DNA伸長反応)とし、これを35サイクル行った。

【0044】

PCR終了後、5 µLの反応溶液をポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、PCR産物を検出した。電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイド溶液で10分間染色した後、紫外線を照射して観察することにより、DNAのバンドを確認した。

【0045】

gyrB遺伝子の塩基配列の決定は、GYPF及びGYPRのプライマーセット又はGP1-F及びGP1-Rのプライマーセットを用いて、ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit及びジェネティックアナライザーABI PRISM310 (アプライド・バイオシステムズジャパン社)で行った。

【0046】

シーケンスの結果得られた *L. hexosus* SBC8050株及び *L. pseudocollinoides* SBC8057株の *gyrB* 遺伝子配列を、それぞれ、配列番号2及び4に示す。また、*Pediococcus damnosus* SBC8023株の *gyrB* 遺伝子配列を、配列番号5に示す。本遺伝子配列について *GenBank* 等のデータベース検索を行ったが、登録されている何れの遺伝子配列とも一致しなかった。

【0047】

(実施例3) *gyrB* 遺伝子を利用した *L. hexosus*、*L. pseudocollinoides* 及び *P. damnosus* の検出及び識別

実施例2と同様の方法により、ビールを混濁させ得る様々な菌株からDNAを抽出し、得られたDNA抽出液について、以下のプライマーセットを用いてPCRを行った。*L. hexosus* 用プライマーセットとして、配列番号6及び7に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドからなるプライマーセット、*L. pseudocollinoides* 用プライマーセットとして、配列番号7及び8に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドからなるプライマーセット、及び *P. damnosus* 用プライマーセットとして、配列番号9及び10に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドからなるプライマーセット。なお、PCRの反応条件は実施例2と同様であり、また、増幅産物の確認も実施例2と同様の方法で行った。

【0048】

表2は、各プライマーセットにより、各種菌株から増幅産物が得られた否かをまとめたものである。

【0049】

【表 2】

供試菌株	<i>L. hexosus</i> 用 プライマーセット	<i>L. pseudocollinoides</i> 用プライマーセット	<i>P. damnosus</i> 用 プライマーセット
<i>Lactobacillus hexosus</i> SBC8050	+	—	—
<i>Lactobacillus hexosus</i> SBC8051	+	—	—
<i>Lactobacillus hexosus</i> SBC8817	+	—	—
<i>Lactobacillus hexosus</i> SBC8818	+	—	—
<i>Lactobacillus pseudocollinoides</i> SBC8057	—	+	—
<i>Lactobacillus pseudocollinoides</i> SBC8058	—	+	—
<i>Lactobacillus pseudocollinoides</i> SBC8063	—	+	—
<i>Lactobacillus pseudocollinoides</i> SBC8064	—	+	—
<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>toruens</i> JCM1166	—	—	—
<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> JCM1164	—	—	—
<i>Lactobacillus collinoides</i> JCM1123	—	—	—
<i>Lactobacillus lindneri</i> VTT-E-89362	—	—	—
<i>Lactobacillus</i> sp. SBC8021	—	—	—
<i>Lactobacillus</i> sp. SBC8019	—	—	—
<i>Lactobacillus brevis</i> SBC8003	—	—	—
<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM1142	—	—	—
<i>Lactobacillus malefementans</i> JCM1167	—	—	—
<i>Lactobacillus buchneri</i> JCM1115	—	—	—
<i>Lactobacillus paracasei</i> JCM1171	—	—	—
<i>Pediococcus damnosus</i> JCM5886	—	—	+
<i>Pediococcus damnosus</i> SBC8023	—	—	+
<i>Pediococcus damnosus</i> SBC8024	—	—	+
<i>Pediococcus acidilactici</i> ID152-3	—	—	—

+: 増幅産物あり

—: 増幅産物なし

JCM: Japan Collection of Microorganisms, Saitama, Japan

VTT: Valtion Teknillinen Tutkimuskeskus, Finland

SBC, ID: サッポロビール分離株

【0050】

表 2 に示した結果から明らかなように、*L. hexosus*用プライマーセットを用いた場合、*L. hexosus*に属する菌株のみに増幅産物（322bp）が確認され、*L. pseudocollinoides*用プライマーセットを用いた場合、*L. pseudocollinoides*に属する菌株のみに増幅産物（362bp）が確認され、*P. damnosus*用プライマーセットを用いた場合、*P. damnosus*に属する菌株のみに増幅産物（194bp）が確認された。このことから、これらのプライマーセットを用いることにより、*L. hexosus*、*L. pseudocollinoides*及び*P. damnosus*を特異的に検出できることが明らかとなった。なお、使用した一部の菌株（サッポロビール分離株）については、実施例 2 と同様の方法により、16S rRNA 遺伝子配列からの菌

種決定を行った。

【0051】

(実施例4) リアルタイムPCRを用いた乳酸菌の検出及び識別

実施例2と同様の方法により調製した様々な菌株からDNA抽出液について、以下のプライマー及びプローブを用いて、表3に示した反応試薬の組成でPCRを行った。プライマーとして、配列番号30に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド(16S rRNA遺伝子のユニバーサルプライマー、5'-TGGAGAGTTTGATCCTGGCTC-3')及び配列番号11~14に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用した。プローブとして、配列番号15及び16に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド(3'末端をリン酸化し、5'末端をLC Red 640でラベルしてある)、配列番号17及び18に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド(3'末端をリン酸化し、5'末端をLC Red 705でラベルしてある)及び配列番号19に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド(3'末端をFITCでラベルしてある)を使用した。

【0052】

【表3】

試薬	容量
LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes*	2.0 μ L
プライマー (10 μ M)	各 1.0 μ L
プローブ (10 μ M)	各 0.4 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	1.6 μ L
滅菌水	7.5 μ L
DNA抽出液	0.5 μ L
合計	20.0 μ L

* : ロシュ・ダイアグノスティックス社製

【0053】

反応装置にLightCyclerクイックシステム330(ロシュ・ダイアグノスティックス社)を用い、95℃で10分間処理した後、1サイクルを95℃で15秒間、50℃で5秒間、72℃で20秒間とし、それを40サイクル繰り返すことによりPCRを行った。

【0054】

PCR終了後引き続き95℃まで温度を上昇させた後、直ちに40℃まで冷却し、同温度を15秒間保持した後、20℃/秒の割合で95℃まで温度を上昇させた。この加熱の間、640nm及び710nmの蛍光強度を0.2℃毎に測定し、その値の一次微分の負の値(-dF/dT)をプロットして生じるピークにより融解温度を決定した。

【0055】

図1は及び図2は、蛍光強度の変化率(-dF/dT)と温度(℃)との関係を表わす融解曲線である。図1は、640nmにおける(a) L. brevis SBC8003株及び(b) L. hexosus SBC8050株の融解曲線を表わし、図2は、710nmにおける(c) L. collinoides JCM1123株、(d) P. damnosus JCM5886株及び(e) L. pseudocollinoides SBC8057株の融解曲線を表わす。

【0056】

図1及び図2に示した結果から明らかなように、L. brevis SBC8003株は640nmで約60℃、L. hexosus SBC8050株は640nmで約56℃及び約63℃、P. damnosus JCM5886株は710nmで約62℃、L. pseudocollinoides SBC8057株は710nmで約64℃の融解温度を示すピークが観察された。また、ビールを混濁させ得る乳酸菌ではないL. collinoides JCM1123株でも710nmで約58℃の融解温度を示すピークが観察されたが、前記のビールを混濁させ得る乳酸菌のピークとは重ならないため、菌の識別が可能で

あった。なお、本実施例において用いた菌株は表 2 に示した菌株と同一であるが、上記以外の菌株は、融解曲線においてピークを示さなかった。

【0057】

このことから、上記プライマー及びプローブを用いることにより、ビールを混濁させ得るすべての乳酸菌を一種類の反応液で検出・識別することが明らかとなった。

【0058】

(実施例 5) リアルタイム PCR を用いた乳酸菌の個別の検出及び識別
実施例 4 で検出・識別された乳酸菌について、確定試験用の条件を検討した。その結果、表 4 に示した目的に応じたプライマー及びプローブを用いて実施例 4 と同様の方法を行うことにより、確定試験を行うことが可能であった。

【0059】

【表 4】

対象菌	プライマー	プローブ	融解温度
<i>L. hexosus</i>	配列番号 6, 8, GYPR	配列番号 20*, 21**	約 57℃
<i>L. pseudocollinoides</i>	配列番号 6, 8, GYPR	配列番号 20*, 21**	約 49℃
<i>L. brevis</i>	配列番号 25, GYPR	配列番号 22*, 23***	約 62℃
<i>L. brevis</i>	配列番号 11, 24	配列番号 15***, 19*	約 60℃

*: 3' 末端を FITC でラベルしてある

** : 3' 末端をリン酸化し、5' 末端を LC Red 705 でラベルしてある

***: 3' 末端をリン酸化し、5' 末端を LC Red 640 でラベルしてある

【図面の簡単な説明】

【0060】

【図 1】 640 nm における (a) *L. brevis* SBC8003 株及び (b) *L. hexosus* SBC8050 株の融解曲線である。

【図 2】 710 nm における (c) *L. collinoides* JCM1123 株、(d) *P. damnosus* JCM5886 株及び (e) *L. pseudocollinoides* SBC8057 株の融解曲線である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sapporo Breweries Ltd.

<120> A method for detecting and determining lactic acid bacteria

<130> 510-1387

<160> 30

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1565

<212> DNA

<213> Lactobacillus hexosus

<220>

<221> source

<222> (1)..(1565)

<223> strain="SBC8050"

<400> 1

```
ttggagagtt tgatcctggc tcaggacgaa cgctggcggc gtgcctaata catgcaagtc      60
gaacgcacag atattaacag aagctgcttg cagtgggaagy taattgatgt gagtggcgga      120
cgggtgagta acacgtgggt aacctacca aaagtggggg ataacatttg gaaacagatg      180
ctaataccgc ataatttaag tgaccacatg gtcacttaat gaaagatggy ttcggctatc      240
acttttggat ggacccgcgg cgtattagct agttggtggg ataacggcct accaaggcga      300
tgatacgtag ccgacctgag agggtaatcg gccacattgg gactgagaca cggcccaaac      360
tcctacggga ggcagcagta gggaatcttc cacaatggac gaaagtctga tggagcaacg      420
ccgcgtgagt gaagaaggtt ttcggatcgt aaaactctgt tgttggagaa gaacagggac      480
tagagtaact gttagtccta tgacggtatc caaccagaaa gccacggcta actacgtgcc      540
agcagccgcg gtaatacgta ggtggcaagc gttgtccgga tttattgggc gtaaagcgag      600
cgcaggcggg tttttaagtc tgatgtgaaa gccttcggct taaccgaaga agtgcattag      660
aaactgggaa acttgagtgc agaagaggag agtggaactc catgtgtagc ggtgaaatgc      720
gtagatatat ggaagaacac cagtggcgaa ggcggctctc tggctctgta ctgacgtga      780
```

ggctcgaaag tatggggagc gaacaggatt agataccctg gtagtccata ccgtaaacga 840
tgaatgctaa gtgttgagg gtttccgcc ttcagtgtg cagctaacgc attaagcatt 900
ccgcctgggg agtacgaccg caaggttgaa actcaaagga attgacgggg gcccgacaaa 960
gcggtggagc atgtggttta attcgaagct acgcgaagaa cttaccagg tcttgacatc 1020
ctttgaccac tgtagagata cagctttccc ttcggggaca aagtgcagg tgggtgcatg 1080
ttgtcgtcag ctctgtctgt gagatgttgg gtttaagtccc gcaacgagcg caacccttat 1140
gactagtgtc cagcattaag ttgggcactc tagtgagact gccggtgaca aaccggagga 1200
aggtggggat gacgtcaaatt cagcatgccc cttatgacct gggctacaca cgtgctacaa 1260
tggttggtac aacgagttgc gaacccgcga gggtaagcta atctcttaaa gccaatctca 1320
gttcggattg taggctgcaa ctgcctaca tgaagtcgga atcgctagta atcgcgatc 1380
agcacgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac accatgagag 1440
tttgaacac ccgaagccgg tggggtaacc tctatgagga gctaaccgtc taaggtggga 1500
cagatgattg ggggtgaagtc gtaacaaggt agccgtagga gaacctgcgg ctggatcacc 1560
tcctt 1565

<210> 2
<211> 517
<212> DNA
<213> Lactobacillus hexosus

<220>
<221> source
<222> (1)..(517)
<223> strain="SBC8050"

<400> 2
cagttctgtg ttacatggt gtggtgctt cagtcgttaa cgctttgtct agccaattaa 60
acgttgaggt ccttaaagaa ggaaaacgt actatatgga tttcaagcgc ggtaaagtta 120
atactgagct taaggttagc ggtacaattc cagaacatga acacggcaca attgttcatt 180
tttggcctga tcatgatatt tttagggaaa caaccgttta tgatattaaa attttaacaa 240

cgcgaaattcg tgagttggcc ttttgaata agggtttacg aattagcatt gaagatttac 300
gtcctgagaa accgaccaa gaagttttcc actatgaagg tggcattaag agttacgttg 360
agtatttaga caacggtaag cacgatcttt ttccagagcc aatttacgtg gaaggtgacg 420
aaaagggaat taaggttgaa gttgctttac aatacactga cgattaccac actaacttga 480
tgaccttcgc caataatatt catacctatg aagtgga 517

<210> 3
<211> 1526
<212> DNA
<213> Lactobacillus pseudocollinoides

<220>
<221> source
<222> (1)..(1526)
<223> strain="SBC8057"

<400> 3
tgatcctggc tcaggatgaa cgctggcggc gtgcctaata catgcaagtc gaacgcatcc 60
cgttaaatga agtgcttgca cggattttta catcggatga gtggcgaact ggtgagtaac 120
acgtgggttaa cctgcccaga agcaggggat aacacttgga aacagggtgct aataccgtat 180
aacaacaaaa accgcatggt ttttgtttga aagggtggtt cggctatcac ttctggaagg 240
acccgcggcg tattagctag ttggtggagt aacggttcac caaggcaatg atacgtagcc 300
gacctgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaactc ctacgggagg 360
cagcagtagg gaatcttcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc gcgtgagtga 420
agaaggtttt cggatcgtaa aactctgttg ttgaagaaga acacgtttga gagtaactgt 480
tcagacgttg acggtattca accagaaagc cacggctaac tacgtgccag cagccgcggt 540
aatacgtagg tggcaagcgt tatccggatt tattgggcgt aaagcgagcg caggcggtta 600
cttaagtctg atgtgaaagc cticggctta accggagaag tgcatcgga actgggtaac 660
ttgagtgcag aagaggacag tggaactcca tgtgtagcgg tgaaatgcgt agatatatgg 720
aagaacacca gtggcgaagg cggctgtctg gtctgttaact gacgctgagg ctcgaaagca 780
tgggtagcga acaggattag ataccctggt agtccatgcc gtaaacgatg aatgctaggt 840

gttggagggt ttccgccctt cagtgccgca gctaacgcat taagcattcc gcctggggag 900
 tacgaccgca aggttgaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat 960
 gtggtttaat tcgaagctac gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatact gtgctaacct 1020
 aagagattag gcgttccctt cggggacgca gatacaggtg gtgcatggct gtcgtcagct 1080
 cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccg cagcagcgca acccttattg tcagttgcca 1140
 gcatttagtt gggcactctg gcgagactgc cggtgacaaa ccggaggaag gtggggatga 1200
 cgtcaagtca tcatgcccct tatgacctgg gctacacacg tgctacaatg gatggtacaa 1260
 cgagttgcga actcgcgaga gcaagctaatt ctcttaaagc cattctcagt tcggactgta 1320
 ggctgcaact cgcctacacg aagtcggaat cgctagtaat ccgcgatcag catgccgcgg 1380
 tgaatacggt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac catgagagtt tgcaacaccc 1440
 aaagtcggtt cggtaacctt cgggagccag ccgcctaagg tggggcagat gattagggtg 1500
 aagtcgtaac aaggtagccg taggag 1526

<210> 4
 <211> 484
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus pseudocollinoides

<220>
 <221> source
 <222> (1)..(484)
 <223> strain="SBC8057"

<400> 4
 ctggtggtct gcatggtgtg gggcatccgt gtgaacgcgc tgtctccgaa ctggacgtta 60
 aggtcgttcg ggacggcaag cgttactaca tggactttgc gtacggccac gtttagaccc 120
 caatgaaggt cattgacgaa gggttaccag aaaacattcg cgggaccacg gtgcatttct 180
 tgccggaccc agatatattc cgggaaacca ctacgtacga cattaagatc ctgaccaccc 240
 ggatccgcga gctggcttct ttaaacaagg gtctgcgcat tactatccgt gatgagcggc 300
 ctgacgagcc aactgaacaa tcctttatgt acgaaggcgg gatccgtcat tacgttgaat 360

atttaaataa aaacaaggat gtcattttcc ctgaaccaat ctatgttgaa ggtgaagaaa 420
agggcacac ggttgaagtt gcgttgcagt ataccgacga ctaccactca aacctgttga 480
cggtt 484

<210> 5
<211> 330
<212> DNA
<213> *Pediococcus damnosus*

<220>
<221> source
<222> (1)..(330)
<223> strain="SBC8023"

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> n stands for any base

<400> 5
ttattgtgcc tgtcaaatnc aagttcttga aggttttgaa gcagttagaa aacgtcccgg 60
aatgtatatt ggggcaacaa gtgcccaagg actccatcat ttagtttggg aaattattga 120
taacggaatt gatgaagctt tagccgggtt tgcggataaa atcgatgtga cggttgaaaa 180
agataatagc attacggttt ttgataatgg ccgaggaatt ccagttggaa tccaggctaa 240
gactggtaaa ccagccctag agacagtttt cacaattttg catgccggtg gtaagtttgg 300
cggcggcgggt tataaagttt caggtgggta 330

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> a primer for *L. hexosus*

<400> 6
gcggtaaagt taatactgag c

21

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> a primer for *L. hexosus* or *L. pseudocollinoides*

<400> 7

atkccctttt cktcaccttc

20

<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> a primer for *L. pseudocollinoides*

<400> 8

gttcgggacg gcaagcgg

18

<210> 9
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> a primer for *P. damnosus*

<400> 9

aagttcttga aggtttg

17

<210> 10
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> a primer for *P. damnosus*

<400> 10

tcggccatta tcaaaa

16

<210> 11
<211> 21

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> a primer

<400> 11
tggttaaata ccgtcaaccc t 21

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> a primer

<400> 12
ggataccgtc actgcatgag 20

<210> 13
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> a primer

<400> 13
ttgaataccg tcaacgtc 18

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> a primer

<400> 14
ccatgtggtc acttaaattc 20

<210> 15
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> a probe

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> LC Red640 labelled

<220>

<221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> phosphorylated

<400> 15

cgccactcgc ttcattggt

19

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a probe

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> LC Red640 labelled

<220>

<221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> phosphorylated

<400> 16

cgccaccac atcaattaac

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a probe

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> LC Red705 labelled

<220>

<221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> phosphorylated

<400> 17

cgccactcac tttatagttg

20

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a probe

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> LC Red705 labelled

<220>

<221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> phosphorylated

<400> 18

cgccactcat ccgatgtt

18

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a probe

<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223> FITC labelled

<400> 19
ggttaccac gtgttactca cc

22

<210> 20
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> a probe

<220>
<221> modified_base
<222> (23)..(23)
<223> FITC labelled

<400> 20
gtggaagtg aagaaaaggg aat

23

<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> a probe

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> LC Red705 labelled

<220>
<221> modified_base
<222> (24)..(24)
<223> phosphorylated

<400> 21
ggttgaagtt gctttacagt acac

24

<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> a probe

<220>
<221> modified_base
<222> (21)..(21)
<223> FITC labelled

<400> 22
cttgtggtag accctcttca a

21

<210> 23
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> a probe

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> LC Red640 labelled

<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> phosphorylated

<400> 23
gtgcattggc gtcttcac

18

<210> 24
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> a primer

<400> 24

cgagcttccg ttgaatgac

19

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a primer

<400> 25

ggtcattcgt ggcgggaaaa a

21

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a primer (GYPF)

<400> 26

ggwtayaarg twtcwgggtgg t

21

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a primer (GYPR)

<400> 27

tcatgygtwc accttcat

18

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a primer (GP1-F)

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> n stands for any base

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> n stands for any base

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n stands for any base

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n stands for any base

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n stands for any base

<400> 28
attatgntgc nngncaaata caa

23

<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> a primer (GP1-R)

<400> 29
accaccwgaw acytrrtawc c

21

<210> 30
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> a universal primer 16S rRNA gene

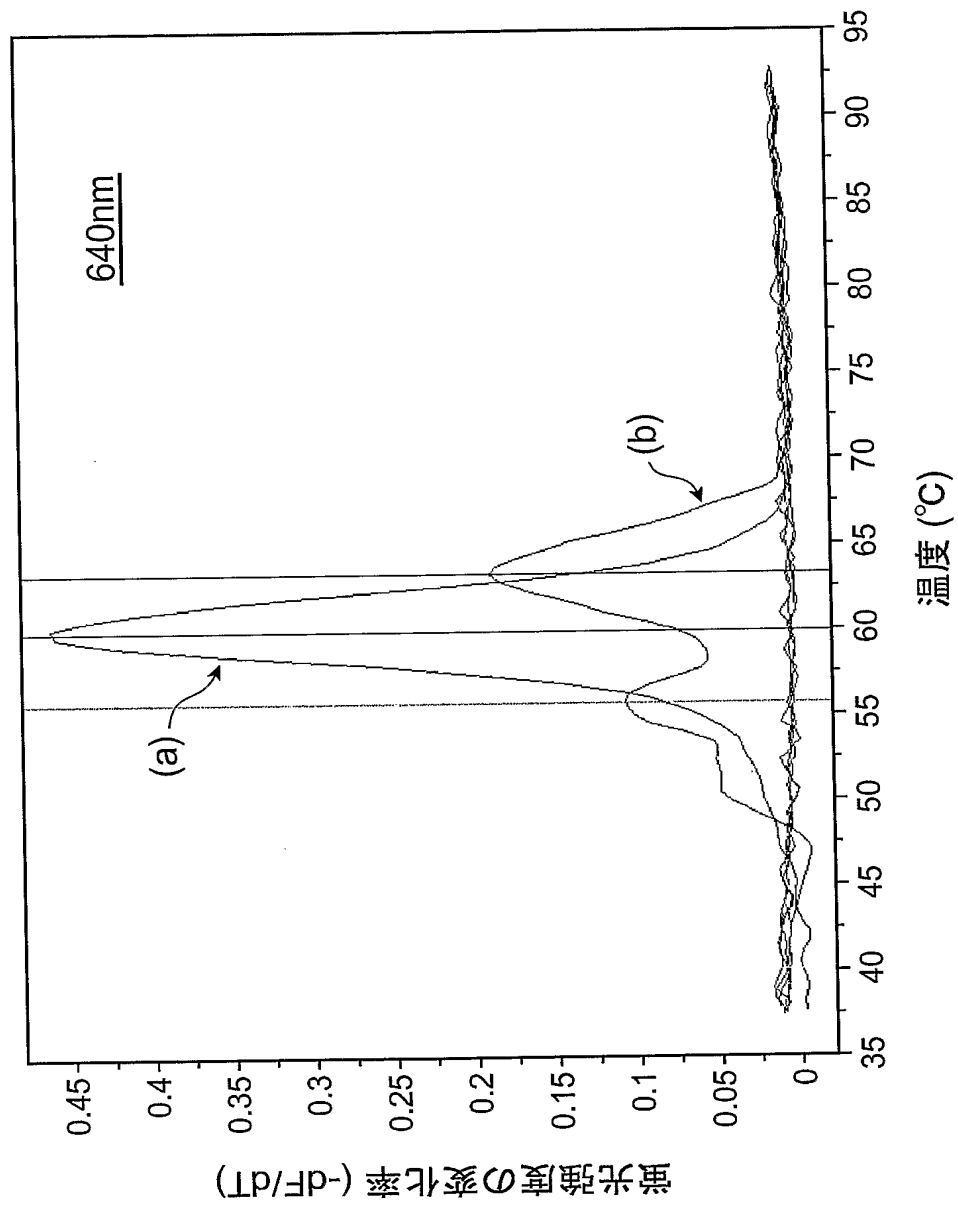
<400> 30

tggagagttt gacctggct c

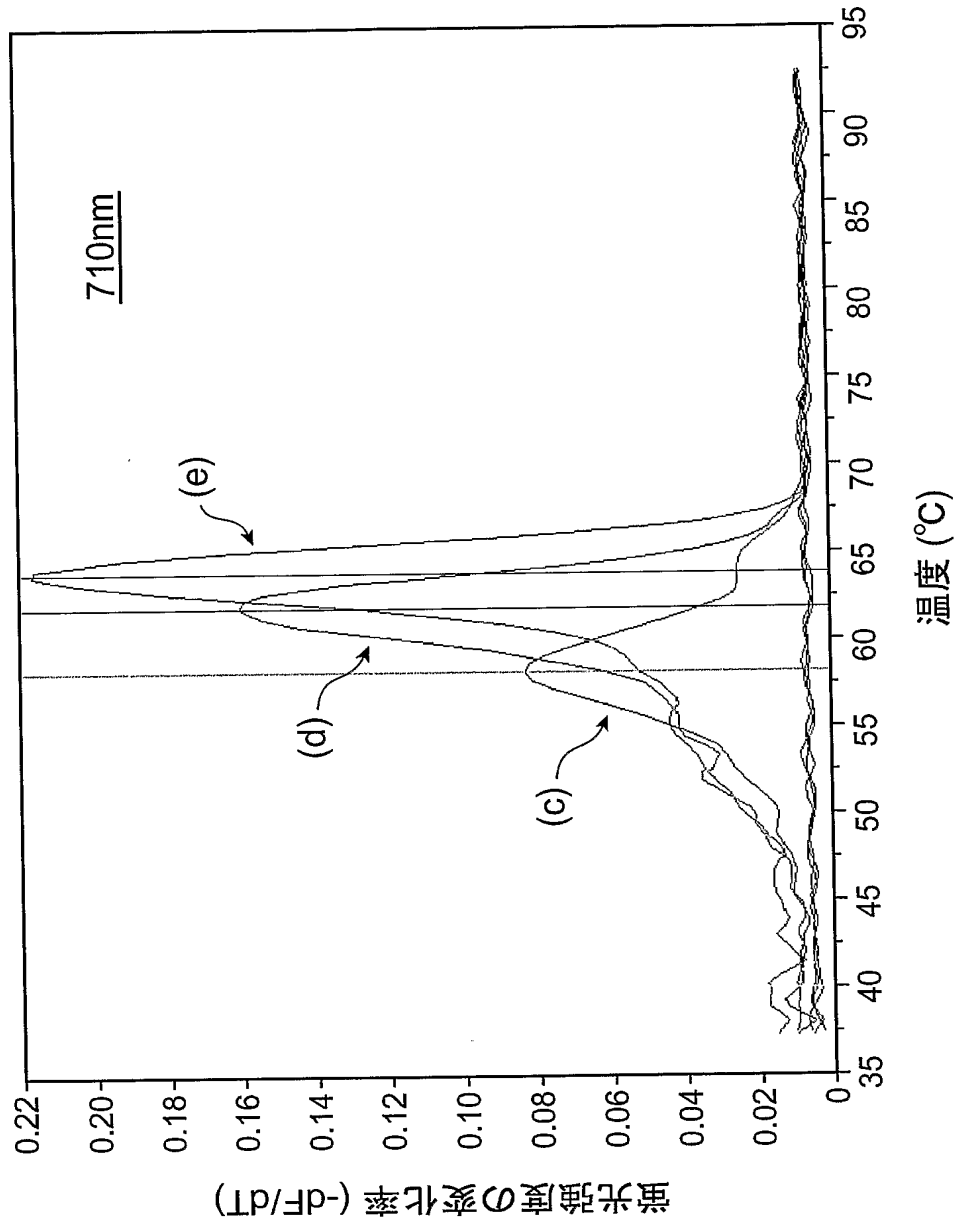
21

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 従来の方法では検出できなかったビールを混濁させ得る乳酸菌を検出する方法、及び当該菌を含めた様々な乳酸菌を同時に検出・識別する方法を提供する。

【解決手段】 配列番号 1 ～ 5 に示す塩基配列の全部又は一部からなるポリヌクレオチド

。

【選択図】 なし。

特願 2 0 0 4 - 0 4 0 3 8 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 0 3 0 4 0 1 8 3]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 7 月 1 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都渋谷区恵比寿四丁目 2 0 番 1 号

氏 名

サッポロビール株式会社